

طراحی و ساخت ناقل خاموش‌گر RNA تداخل‌گر (RNAi) نسل دوم برای بررسی کاهش بیان ژن کمک فعال‌کننده RNA گیرنده استروئیدی (SRA)

سعیده عسکریان^۱، مهدی فروزنده^{۲*}، فاطمه رهبری‌زاده^۳، لیدا لنگرودی^۱

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۸/۱۳

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۰۸

چکیده

هدف: روش تداخل RNA یا RNAi بهترین روش خاموش کردن ژن‌ها در سطح ترانس‌کریپتومی شناخته شده است، سرطان‌ها و بیماری‌های ژنتیکی اهداف مهمی برای توسعه روش‌های درمانی مبتنی بر RNAi به‌شمار می‌روند. برای حل مشکل خاموشی موقتی سیستم‌های siRNA، shRNAهای سنجاق سری یا shRNAها ابداع شدند و نسل جدید shRNAها به نام shRNAmir است. سازه خاموش‌گر با ساختار سنجاق سری شبه microRNA (shRNAmir)، رفتاری مشابه یک microRNA طبیعی را درون سلول تقلید می‌کند. کمک فعال‌کننده گیرنده استروئیدی (SRA) یکی از تنظیم‌کننده‌های گیرنده استروئیدی از جمله گیرنده استروژنی (ER) است. بافت‌های پروستات، رحم و سینه بیان پایینی از SRA دارند، در حالی که طی تومورزایی آن‌ها بیان SRA افزایش می‌یابد، بنابراین امکان شرکت SRA در تومورزایی یا پیشروی توموری وجود دارد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر از روش RNA تداخل‌گر یا RNAi برای خاموش نمودن ژن SRA استفاده شد و سازه خاموش‌گر SRA طراحی و توسط Soe-PCR ساخته شد و سپس در پلاسمید pEGFPc1 که یک ناقل بیانی است کلون گردید. رده سلولی انسانی سرطان پستان (MCF7) با پلاسمید حاصل ترانسفکت شد و بیان SRA در زمان‌های ۲۴، ۷۲ ساعت و ۱۰ روز بعد با Real-Time PCR بررسی شد. **نتایج:** کاهش ۶۰ درصدی در بیان نسبی SRA در تیمارهای ۷۲ ساعت و ۱۰ روز بعد مشاهده شد که نشان می‌دهد shRNAmir-SRA با موفقیت توانسته است بیان ژن هدف مطالعه حاضر را به‌طور نسبتاً پایداری خاموش کند.

نتیجه‌گیری: با توجه به موفقیت در طراحی و ساخت یک سازه shRNAmir و خاموشی نسبتاً پایدار ژن هدف، این سازه برای مطالعات مختلفی در آینده آماده و مناسب به‌نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: RNA تداخل‌گر، shRNAmir، کمک فعال‌کننده گیرنده استروئیدی (SRA)، سرطان پستان

۱- مقدمه

RNA تداخل‌گر (RNA interference: RNAi)، کاهش وابسته به توالی را بعد از رونویسی ژن‌های هدف، مکانیسمی است که طی تکامل حفاظت شده است و تنظیم مقدور می‌سازد و به‌عنوان ابزاری کارآمد برای خاموش کردن

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
Email: foroz@modares.ac.ir

اختصاصی ژن‌ها در سطح ترانس‌کریپتومی (Transcriptome level) است [۳-۱].

در این تحقیق نسل جدیدی از RNAهای سنجاغ سری shRNA (small hairpin RNA) که آن را shRNAmir (microRNA-adapted shRNA) می‌نامند و مشابه رونوشت اولیه miRNA (primary microRNA: pri-miRNA) است، استفاده شده است. در این حالت روی shRNAmir مورد نظر، توالی خاموش‌گر هدف، جایگزین توالی miRNA شده و نواحی سنس (Sense)، حلقه و آنتی‌سنس (Antisense) مشابه با ساختار shRNA است و نواحی محصور (Flanking site) ۳' و ۵' در دو طرف ساختار تعبیه شده و پس از رونویسی در هسته تحت تأثیر آنزیم دروشا (Drosha) پردازش می‌شود. این امر سبب می‌شود تا بعد از ورود به سیتوپلاسم آنزیم دایسر (Dicer) با اختصاصیت بیشتری رونوشت را شناسایی و برش بدهد و ادامه مسیر RNAi برای shRNA، siRNA و shRNAmir مشترک است [۴، ۵].

استروژن فرایندهای زیستی بسیاری را تنظیم می‌کند [۶]. استروژن همچنین در فرایندهای آسیب‌شناسی بیماری‌های وابسته به هورمون مثل سرطان تخمدان، سینه، روده و استخوان نیز تأثیر دارد [۷]. استروژن فعالیت خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های استروژنی انجام می‌دهد. این گیرنده‌ها از طریق واکنش با کمک تنظیم‌کننده‌ها، تغییرات کروماتینی و هیستونی به توالی خاص پاسخ‌دهنده به استروژن متصل شده و با هدایت مجموعه پیش‌آغازین، در نهایت سبب رونویسی ژن‌های هدف می‌شوند. بنابراین شناسایی این کمک تنظیم‌کننده‌ها نقش مهمی در مطالعه عوامل دخیل در سرطان و ایجاد هدف‌های ژن درمانی جدید دارد [۸-۱۰].

آقای لنز (Lanz) و همکارانش در سال ۱۹۹۹ طی بررسی کمک تنظیم‌کننده‌های گیرنده استروژنی، توانستند یک کلون جدید را شناسایی کنند و آن را کمک فعال‌کننده RNA گیرنده استروئیدی (Steroid Receptor RNA: SRA) نامیدند. تلاش‌های آقای لنز برای تولید پروتئین از روی رونوشت

cDNA ژن SRA ناموفق بود [۱۱] و در مجموع این اطلاعات و مطالعات بعدی نشان داد که SRA فعالیت خود را در قالب یک RNA و نه پروتئین انجام می‌دهد [۱۲]. SRA در حالت طبیعی بیان بالایی در کبد، عضله اسکلتی، غده آدرنال و غده هیپوفیز دارد، در حالی‌که به میزان متوسطی در جفت، ریه، کلیه و پانکراس بیان می‌شود. جالب این‌که مغز و دیگر بافت‌های پاسخ‌دهنده به استروئید مثل پروستات، سینه، رحم و تخمدان بیان کمی از SRA RNA دارند [۱۳]. بنابراین بیان بالای SRA می‌تواند مشخص‌کننده زیرگروهی از آسیب‌ها باشد.

علاوه بر نقش SRA در گیرنده‌های استروئیدی، احتمال شرکت SRA در مسیرهای پیام‌رسان سلولی نیز مطرح شده که هنوز نامشخص است. بنابراین بررسی‌ها و مطالعات بیشتر به منظور یافتن مولکول‌هایی که با SRA برهم‌کنش دارند و مسیرهایی که SRA در آن شرکت می‌کند، در فهمیدن نقش SRA در درون سلول و مسیرهای کنترلی آن حایز اهمیت است. در این مطالعه سازه خاموش‌گر SRA با استفاده از اصول مطرح در نسل دوم shRNAها طراحی شد.

هدف از این تحقیق طراحی و ساخت ناقل خاموش‌گر ژن SRA بر پایه اصول مطرح شده در طراحی نسل دوم shRNA و بررسی قابلیت آن بر خاموش کردن ژن هدف در سلول‌های سرطان پستان انسانی MCF7 است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- طراحی و ساخت ناقل خاموش‌گر

به‌منظور طراحی سازه خاموش‌گر از نرم‌افزارهای طراحی siRNA که به‌صورت آنلاین (Online) وجود داشت استفاده شد و بعد از بررسی الگوهای خاموش‌گر شرکت‌های GENOMICS، MIT، Ambion و OPEN BIOSYSTEMS قطعه خاموش‌گری که تقریباً همه شرکت‌ها بر آن اتفاق نظر داشتند مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از

برنامه بلاست (BLAST) در بانک اطلاعاتی NCBI (National Center for Biochemistry Information) ترتیب نوکلئوتیدهای آن بررسی شده و صحت توالی آن تأیید شد. طول توالی با احتساب نواحی محصور ۳' و ۵' و جایگاه‌های برش آنزیمی و قطعه لازم برای همپوشانی الیگوهای shRNA، ۱۲۶ باز در نظر گرفته شد. پس از طراحی سازه خاموش‌گر، سازه به صورت دو قطعه ۷۵ و ۶۵ نوکلئوتیدی که دارای ۱۴ نوکلئوتید همپوشان بود برای ساخت به شرکت آلفا (Alpha) کانادا سفارش داده شد و با استفاده از روش Soe-PCR (Splicing by Overlapping Extension PCR) به هم متصل و تکثیر شدند سپس با برش نواحی شناسایی آنزیم محدودگر

که در دو طرف سازه خاموش‌گر طراحی شده بود، قطعه خاموش‌گر ژن SRA ابتدا در پلاسمید PCDNA3/H1 کلون شد و سپس قطعه خاموش‌گر همراه با پروموتور H1 که درون این پلاسمید وجود داشت با دو آنزیم محدودکننده BamHI و HindIII برش داده و در پلاسمید PEGFPC1 کلون شد. پلاسمید حاصل GSA نامیده شد و دارای ژن EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) است که پیگیری روند ترانسفکشن (Transfection) و رفتار سلولی را از طریق مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت مقدر می‌سازد. توالی قطعات خاموش‌گر در جدول ۱ نشان داده شده و قسمت‌های همپوشان پررنگ‌تر مشخص شده است.

جدول ۱ الیگوهای ساخت قطعه shRNAmir

5'-TGCGGATCCCCTGCTGTTGACAGTGAGCGCGGCTTCCAGCAGGCTTCATAATAGTGAAGCCACAG-3'	Pro1
5'-TCCAAGCTTTTCCAAAAATCCGAGGCAGTAGGCAAGGCTTCCAGCAGGCTTCATAATACATCTGTGGCTTCACTA-3'	Pro2

دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس ترکیب پلاسمید و لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر مخلوط و ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمپلکس لیپوفکتامین-DNA (Lipofectamin-DNA) ایجاد شود. کمپلکس تشکیل شده به آرامی به محیط سلول‌ها اضافه شده و پلیت به مدت ۴-۶ ساعت در انکوباتور قرار داده شد؛ برای هر گروه ۲ چاهک در نظر گرفته و بعد از این مدت محیط سلول‌ها با محیط کامل تعویض شد. در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت و ۱۰ روز بعد، RNA سلول‌ها تخلیص و از روی آن‌ها cDNA ساخته و تغییر بیان ژنی برای هر چاهک با سه بار تکرار بررسی شد.

۲-۴- استخراج RNA و سنتز بیان cDNA

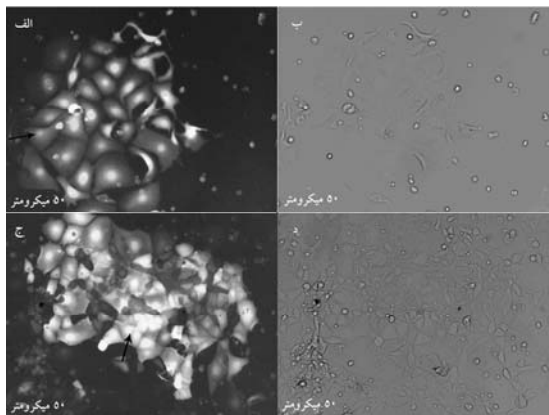
RNA سلول‌ها با استفاده از دستورالعمل کیت RNX-PLUS (Fermentase) تخلیص شد و پس از اندازه‌گیری جذب نوری توسط دستگاه فتومتر، یک میکروگرم از RNA استخراج شده برای سنتز cDNA با استفاده از کیت RT-PCR به کار رفت.

۲-۲- کشت سلولی

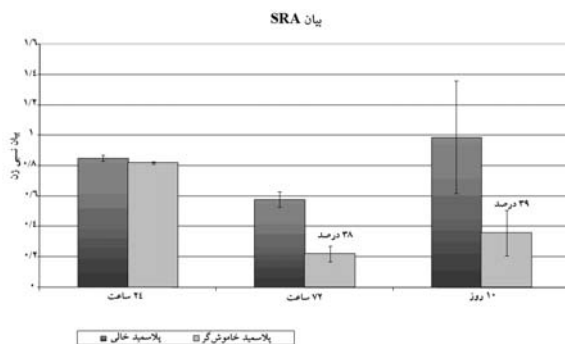
سلول‌های MCF7 از مؤسسه انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها در محیط DMEM همراه با FBS (Fetal Bovine Serume) ۱۰ درصد و در انکوباتور ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند.

۲-۳- ترانسفکشن سلول‌ها

دو گروه سلول در نظر گرفته شد، گروه اول سلول‌هایی که با پلاسمید PEGFPC1 خالی بدون قطعه خاموش‌گر به عنوان کنترل منفی ترانسفکت شدند و گروه دوم سلول‌هایی که با پلاسمید GSA خاموش‌گر ترانسفکت شدند. برای هر نمونه کمپلکس لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (LipofectaminTM 2000) (Invitrogen) به شرح زیر آماده شد: مقدار ۰/۸ میکروگرم از پلاسمید خاموش‌گر در ۵۰ میکرولیتر DMEM بدون سرم رقیق و چند بار به آرامی مخلوط شد. مقدار ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین در ۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM بدون سرم مخلوط شده و



شکل ۱ تصویر فلورسنت (الف) و فاز کنتراست (ب) سلول‌های MCF7 در نتیجه ترانسفکشن با پلاسمید خاموش‌گر بعد از ۷۲ ساعت و تصویر فلورسنت (ج) تصویر فاز کنتراست (د) سلول‌ها در نتیجه ترانسفکشن با پلاسمید خاموش‌گر بعد از ۱۰ روز



شکل ۲ نمودار مقایسه بیان ژن SRA در نمونه ترانسفکت شده با پلاسمید خالی pEGFP1 و پلاسمید خاموش‌گر؛ در زمان ۲۴ ساعت تفاوت چشمگیری بین نمونه کنترل منفی و خاموش‌گر مشاهده نمی‌شود در حالی که در زمان ۷۲ ساعت بیان SRA نسبت به گروه کنترل منفی ۳۹ درصد است که این به معنی کاهش ۶۱ درصدی در بیان ژن مورد نظر نسبت به کنترل منفی است و کاهش ۶۲ درصدی در تیمار بعد از ۱۰ روز نیز مشاهده می‌شود.

در شکل ۲ میزان نسبی بیان SRA نسبت به تیمار کنترل منفی در زمان ۲۴ ساعت تغییر چشمگیری نداشته است، اما در زمان ۷۲ ساعت بیان SRA به ۰/۳۹ کاهش یافته که نشان‌دهنده کاهش ۶۱ درصدی میزان mRNA ژن SRA در سلول نسبت به میزان آن در مقایسه با سلول‌های کنترل است. این کاهش بیان بعد از ۱۰ روز نیز به مقدار ۰/۳۸ بود که نشان‌دهنده کاهش ۶۲ درصدی میزان mRNA ژن SRA در سلول نسبت به میزان

۲-۵- بررسی اثر خاموش‌کنندگی با

Real-Time PCR

به منظور بررسی میزان مهار ژن SRA از کیت Mastermix Real-Time PCR (Takara) SYBR Green (Rotor gene2000) استفاده شد. واکنش‌ها از نوع کمی-نسبی (Relative quantification) صورت گرفت که در آن بیان ژن هدف در مقایسه با یک ژن خانه‌دار (Housekeeping gene) مثل بتا-اکتین (β -actin) به عنوان کنترل داخلی مقایسه شد. سپس از فرمول Pfaffle برای محاسبه بیان ژن و آزمون آماری آنووا (ANOVA) و توکی (Tukey) برای بررسی نتایج استفاده شد. توالی آغازگر (Primer) ژن‌های بتا-اکتین و SRA در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ توالی آغازگر ژن‌های بتا-اکتین و SRA

5'-ACAAGGAAGCAGGTATGTGATG-3'	RE-SRA1-F
5'-ATGAGGGAGCGGTGGATG-3'	RE-SRA1-R
5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3'	F-بتا-اکتین
5'-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'	R-بتا-اکتین

F: جلویی، R: برگشتی

۳- نتایج

سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خاموش‌گر در زمان‌های ۲۴، ۷۲ ساعت و ۱۰ روز ابتدا با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند و سپس بیان ژن مورد نظر آن‌ها بررسی شد، مشاهده سلول‌های سبز رنگ در زمان‌های ۷۲ ساعت و ۱۰ روز نشان می‌دهد که پلاسمید خاموش‌گر به خوبی وارد سلول شده و از آن رونویسی صورت می‌گیرد.

مشاهده سلول‌های سبز رنگ در شکل‌های الف و ج نشان‌دهنده این امر است که پلاسمید در این سلول‌ها بیان می‌شود و مشاهده سلول‌های سبز رنگ (در شکل ۱ سلول‌های سبز رنگ یا ترانسفکت شده نسبت به زمینه به رنگ روشن‌تری هستند) در روز ۱۰ بدین معناست که زمانی که سلول‌ها به حالت نسبتاً پایداری رسیده‌اند و پلاسمید مورد نظر در آن‌ها بیان می‌شود (شکل ۱).

و در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت و ۱۰ روز بعد، RNA سلول‌ها تخلیص و از روی آن‌ها cDNA ساخته شد؛ تغییر mRNA ژن‌های هدف یا به عبارت بهتر تغییر بیان ژنی بررسی شد. بررسی بیان ژن SRA با استفاده از Real-Time PCR بعد از زمان ۲۴ ساعت تفاوت چشمگیری بین بیان ژن SRA در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خاموش گر GSA و سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی PEGFPC1 نشان نداد که قابل انتظار بود زیرا در این موقع هنوز سلول پاسخی به عامل خارجی وارد شده نداده است و احتمال این‌که پلاسمیدها هنوز وارد هسته نشده باشند و در ژنوم جای‌گیری نکرده باشند، وجود دارد. البته سلول به عوامل ترانسفکشن واکنش نشان داده که در نمونه کنترل منفی و خاموش گر مشابه است.

بررسی بیان ژن SRA در زمان ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن، ۶۱ درصد نسبت به نمونه کنترل منفی کاهش نشان داد، در این زمان سلول‌ها در بهترین وضعیت در مقابل عامل خارجی وارد شده، قرار دارند.

بعد از زمان ۱۰ روز که سلول‌ها به حالت پایدار رسیده‌اند کاهش بیان ژن SRA حدود ۶۲ درصد نسبت به نمونه کنترل منفی است و بیان‌گر یک خاموشی پایدار در سلول‌هایی است که تحت تأثیر سازه خاموش گر مورد نظر بررسی حاضر قرار گرفته‌اند.

در مطالعاتی که توسط کوپر (Cooper) و همکارانش انجام شد این نظریه که RNA SRA غیرکدکننده از طریق افزایش بیان ژن‌هایی مثل PLAU (Plasminogen Activator, Urokinases) ممکن است مستقیماً در ایجاد یک فنوتیپ مهاجم در سلول‌های سرطانی سینه دخالت داشته باشند مطرح شد. PLAU نقشی کلیدی در ایجاد، پیشروی و متاستاز (Metastase) سلول‌های سرطانی از طریق فعال کردن چندین متالوپروتئیناز (Metalloproteinase) دارد. به‌علاوه در این مطالعه در رده سرطانی MDA-MB231 با استفاده از اولیگونوکلوئوتید خاموش گر تغییر یافته‌ای که باعث فعال شدن مکانیسم RNaseH می‌شد، بیان ژن SRA به اندازه ۷۰ درصد کاهش

آن در مقایسه با سلول‌های کنترل است و تقریباً برابر با میزان کاهش در زمان ۷۲ ساعت است.

۴- بحث

siRNA اولین خاموش‌گر سنتزی بود که توانست با موفقیت در سلول‌های پستانداران بیان ژن هدفش را به‌طور موقتی کاهش دهد، این کاهش بیان موقتی که معمولاً ۳-۵ روز در محیط کشت طول می‌کشد، برای بررسی آثار طولانی مدت خاموشی ژن، مناسب نیست، محدودیت دیگر در استفاده از siRNAها، هزینه سنتز و متفاوت بودن بازدهی ترانسفکشن در رده‌های سلولی مختلف است [۱۴].

بنابراین ساختارهای سنجاق سری طراحی شدند که قسمتی از مشکلات siRNA را حل می‌نمود [۱۵] در این راستا سیلوا (Silva) و همکارانش مدلی را مطرح نمودند که ساختاری مشابه یک microRNA طبیعی سلولی بود که توسط خود سلول ساخته می‌شد و این مدل را shRNAmir نامیدند [۴] بنابراین با الگوبرداری از ساختار miRNAهای طبیعی به‌عنوان یک عامل داخلی در مسیر RNAi، shRNA یا RNAهای سنجاق سری ابداع شدند که توسط ناقل‌های DNA تولید می‌شوند و ساختار ساقه-حلقه‌ای مثل miRNA را تقلید می‌کردند [۱۶].

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر انجام شده در چندین سال گذشته، هنوز چالش‌هایی تکنیکی برای طراحی RNAهای مؤثرتر و استفاده از آن‌ها در شرایط درون بدنی (In vivo) و شرایط آزمایشگاهی (In vitro) وجود دارد و هنوز هم تمامی توالی‌های shRNA یا shRNAmir در خاموش کردن بیان ژنی موفق نیستند بنابراین مطالعات بیشتر به‌منظور بهینه‌سازی و تکامل سازه‌های ایجاد کننده مکانیسم RNAi درون سلول به‌منظور استفاده و کاربرد این روش در روش‌های ژن درمانی ضروری و لازم به نظر می‌رسد [۱۷].

در این مطالعه پلاسمید GSA طراحی و ساخته شده با استفاده از Lipofectamin 2000 وارد سلول‌های MCF7 شد

به‌علاوه با توجه به در دسترس بودن سازه خاموش‌گر ژن SRA به‌عنوان یک کمک فعال‌کننده گیرنده استروئیدی، می‌توان به بررسی آثار خاموش‌گری آن بر ژن‌های مختلف و عوامل دیگر سلولی از جمله اثر آن بر رشد سلولی و بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) پرداخت.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در این تحقیق ما را یاری دادند به‌ویژه خانم رجبی و خانم ماکولاتی کمال تشکر را داریم.

داده شد و جالب این‌که در بیان ژن‌های Bcl2, TFF1 و DLC1 تغییری ایجاد نشد. با این حال این کاهش بیان SRA بر ژن‌های دیگری از جمله NME1 اثر می‌گذارد [۱۸].

با مقایسه بیان ژنی در زمان‌های ۷۲ ساعت و ۱۰ روز، زمان‌هایی که سلول تقریباً به حالت پایدار خود رسیده است کاهش بیان ژن SRA به‌صورت ثابت حدود ۶۰ درصد مشاهده می‌شود و این نشان می‌دهد که طراحی و ساخت پلاسمید خاموش‌گر با استفاده از shRNA نسل دوم با موفقیت انجام شده و به‌خوبی و به‌صورت نسبتاً پایدار قادر به خاموش کردن ژن هدفش است؛ بنابراین برای کاربردهای آینده مناسب است.

۶- منابع

- [1] MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(2): 512-7.
- [2] Robb GB, Rana TM. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* 2007; 26(4): 523-37.
- [3] Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* 2007; 13(11): 1894-910.
- [4] Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ, Hannon GJ. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* 2005; 37(11): 1281-8.
- [5] Cleary MA, Kilian K, Wang Y, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, Leproust E, Coffey EM, Burchard J, McCombie WR, Linsley P, Hannon GJ. Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. *Nat Methods* 2004; 1(3): 241-8.
- [6] Fox EM, Andrade J, Shupnik MA. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009; 74(7): 622-7.
- [7] Santen RJ, Song RX, Masamura S, Yue W, Fan P, Sogon T, Hayashi S, Nakachi K, Eguchi H. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv Exp Med Biol* 2008; 630: 19-34.
- [8] Wolf IM, Heitzer MD, Grubisha M, DeFranco DB. Coactivators and nuclear receptor trans-activation. *J Cell Biochem* 2008; 104(5): 1580-6.
- [9] Lonard DM, O'Malley BW. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* 2006; 125(3): 411-4.

- [10] Fuxreiter M, Tompa P, Simon I, Uversky VN, Hansen JC, Asturias FJ. Malleable machines take shape in eukaryotic transcriptional regulation. *Nat Chem Biol* 2008; 4(12): 728-37.
- [11] Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 1999; 97(1): 17-27.
- [12] Barrandon C, Spiluttini B, Bensaude O. Non-coding RNAs regulating the transcriptional machinery. *Biol Cell* 2008; 100(2): 83-95.
- [13] Lanz RB, Chua SS, Barron N, Söder BM, DeMayo F, O'Malley BW. Steroid receptor RNA activator stimulates proliferation as well as apoptosis in vivo. *Mol Cell Biol* 2003; 23(20): 7163-76.
- [14] Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett* 2005; 579(26): 5974-81.
- [15] Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 2005; 23(2): 227-31.
- [16] Pekarik V. Design of shRNAs for RNAi-A lesson from pre-miRNA processing: possible clinical applications. *Brain Res Bull* 2005; 68(1-2): 115-20.
- [17] Rossi JJ. Expression strategies for short hairpin RNA interference triggers. *Hum Gene Ther* 2008; 19(4): 313-7.
- [18] Cooper C, Guo J, Yan Y, Chooniedass-Kothari S, Hube F, Hamedani MK, Murphy LC, Myal Y, Leygue E. Increasing the relative expression of endogenous non-coding Steroid Receptor RNA Activator (SRA) in human breast cancer cells using modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(13): 4518-31.