

Original Article

Designing and producing of RNA interference (RNAi) in order to reduce the expression of a candidate gene involved in cancer

Fatemeh Yousefi, Zahra Shabaninejad, Bahram Mohammad Soltani*, Mehrdad Behmanesh

Department of Molecular Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: soltanib@modares.ac.ir

Received: 9 April 2016 Accepted: 8 May 2016 First Published online: 5 February 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 April-May;40(1):91-96

Abstract

Background: Cancer is one of the most important factors which affect the human health .RNA interference (RNAi) based therapies have been developed and showed significant results in this regard. One of the most important problems of siRNA system is its low stability. In order to overcome to this weakness, various types of hairpin RNA or shRNA was introduced. Over expressed colorectal cancer gene (OCC-1), which has several transcripts is considered as a hallmark of colorectal cancer. This gene has vital role in the development and progression of cancer through the cell signaling pathways, which are involved in cell proliferation. In the present study, the RNAi system was utilized in order to reduce the expression of specific transcript of OCC-1 gene.

Methods: The silencer structure was designed and cloned in the expression vector pRNA-H1.1 / Neo which has a promoter for RNAPolIII. Plasmid was transferred into the colorectal cancer cell line, and the expression of transcript was compared to the control samples at 24 and 72 h post transfection by Real-Time PCR.

Results: The expression of transcript was reduced about 25 % at 72 h post transfection following shRNA transfection, compared to the control sample.

Conclusion: The designed shRNA structure successfully reduced the expression of target gene; accordingly, it can be used in future studies in order to investigate the effect of these transcripts on development and progression of colorectal cancer.

Keywords: RNA Interference (RNAi), Colorectal Cancer, Real-Time PCR, shRNA

How to cite this article: Yousefi F, Shabaninejad Z, Mohammad Soltani B, Behmanesh M. [Designing and producing of RNA interference (RNAi) in order to reduce the expression of a candidate gene involved in cancer]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 April-May;40(1):91-96. Persian.

مقاله پژوهشی

طراحی و ساخت RNA تداخلگر (RNAi) باهدف کاهش بیان ژن کاندید درگیر در سرطان

فاطمه یوسفی، زهرا شبانی‌نژاد، بهرام محمدسلطانی*، مهرداد بهمنش

گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
* نویسنده مسؤول: ایمیل: soltanib@modares.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷؛ ۴۰(۱): ۹۱-۹۶

چکیده

زمینه: سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل تهدید کننده سلامت محسوب می‌شود. توسعه روش‌های درمانی مبتنی بر فرایندهای RNA های تداخلگر (RNAi) نتایج قابل قبولی را به دنبال داشته است. یکی از مهم‌ترین مشکلات سیستم‌های siRNA، پایداری کم آن می‌باشد. از جمله راهکارهای غلبه بر این ضعف، معرفی انواع مختلفی از RNAهای سنجاق‌سری یا shRNA بوده‌است. ژن OCC-1 (Overexpressed in Colon Carcinoma) دارای رونوشت‌های متعددی می‌باشد که به عنوان مشخصه سرطان کولورکتال در نظر گرفته شده است. این ژن نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت سرطان کولورکتال از طریق مسیرهای پیام‌رسان سلولی دخیل در تکثیر سلولی دارد. در تحقیق حاضر از روش RNA تداخلگر یا RNAi به منظور کاهش بیان رونوشت ویژه‌ای از ژن OCC-1 استفاده شده است. روش کار: سازه‌خاموش‌گر طراحی شد و سپس در ناقل بیانی pRNA-H1.1/Neo که دارای پروموتور برای RNAPolIII می‌باشد، کلون گردید. پلاسمید در رده سلولی سرطان کولورکتال ترانسفکت گردید و بیان رونوشت OCC-1 در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن نسبت به نمونه کنترل با روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها: بیان رونوشت OCC-1 در زمان ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن، نسبت به نمونه کنترل حدود ۲۵ درصد کاهش یافت. نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد سازه shRNA طراحی شده به صورت موفقیت‌آمیزی باعث کاهش بیان ژن مورد هدف شده است که با توجه به نتایج می‌توان از آن در مطالعات آینده به منظور کشف تأثیر این رونوشت بر ایجاد یا پیشرفت سرطان کولورکتال، استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: RNA های تداخلگر (RNAi)، سرطان کولورکتال، Real-time PCR، shRNA

نحوه استناد به این مقاله: یوسفی ف، شبانی‌نژاد ز، محمدسلطانی ب، بهمنش م. طراحی و ساخت RNA تداخلگر (RNAi) باهدف کاهش بیان ژن کاندید درگیر در سرطان. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۱): ۹۱-۹۶

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کربیتو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

پرایمرهای همپوشان، با شرایط ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، برای ۴۰ سیکل انجام شد. سپس محصول PCR به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق و در وکتور pTG19-TA کلون گردید. با برش نواحی شناسایی آنزیم محدودگر HindIII و BamHI که در دو طرف سازه خاموش گر طراحی شده بود قطعه خاموشگر ژن مورد هدف برش داده و در ناقل بیانی pRNA-H1.1/Neo که دارای پروموتور H1 است، ساب کلون شد. واکنش الحاق توسط آنزیم T4DNA (Fermentas) لیگاز و بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام گرفت.



شکل ۱: تشکیل حالت ساقه-حلقه سازه خاموشگر با استفاده از نرم افزار <http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>

کشت سلولی و ترانسفکشن سلول ها

رده سلولی SW480 از موسسه ATCC و به نمایندگی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلولها در محیط H-DMEM همراه با ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serume) و ۱ درصد آنتی بیوتیک در انکوباتور با ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. تعداد ۶۰ هزار سلول در هر یک از چاهکهای پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت و بعد از ۲۴ ساعت ترانسفکشن انجام شد. به منظور ترانسفکشن سازه طراحی شده، دو گروه سلول در نظر گرفته شد، گروه اول سلولهایی که با پلاسمید pRNA-H1.1/Neo بدون قطعه خاموشگر به عنوان کنترل منفی آزمون و گروه دوم سلولهایی که با پلاسمید حاوی خاموشگر ترانسفکشن شدند. همچنین به منظور بررسی میزان ترانسفکشن سازه مورد نظر با میکروسکوپ فلورسنت، از پلاسمید هم‌اندازه وکتور pRNA-H1.1/Neo حاوی قطعه خاموشگر که دارای ژن Green (Fluorescent Protein) GFP بود، استفاده شد و ترانسفکشن دقیقاً با شرایط یکسان انجام گردید. به منظور ترانسفکشن سلولها از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (LipofectaminTM 2000) (Invitrogene) استفاده شد. برای هر نوع ترانسفکشن سلولهای انسانی، لازم است کمپلکسی متشکل از DNA (وکتورهایی که باید به سلول انتقال یابند)

سیستم‌های RNAi (RNA interference) در بررسی عملکرد ژنهای مختلف مسیرهای سلولی دخیل در ایجاد بیماری از جمله سرطانها کاربردهای فراوانی دارند که توجه محققان را به خود جلب کرده است (۱). از آنجاییکه رشد غیرتنظیم شده تومورها به اکتساب تدریجی وقایع ژنتیکی نسبت داده شده است و این وقایع منجر به روشن شدن ژنهای پیش‌برنده تکثیر، خاموشی ژنهای درگیر در ممانعت از تکثیر و غلبه بر ژنهای دخیل در مرگ سلولی می‌شود، بنابراین دور از انتظار نیست که استفاده از فرایندهای مبتنی بر RNA های تداخلگر برای تنظیم بیان ژنها به منظور مقابله با چنین بیماری‌هایی مناسب به نظر برسد (۲-۳). در سال ۲۰۰۱ باغبالگری تمایزی بین رده‌های سلولی مربوط به کارسینومای کولون و سلولهای نرمال مخاط کولون، ناحیه‌ی جدیدی از ژنوم شناسایی شد که دو رونوشت حاصل از آن در کارسینومای کولون افزایش بیان نشان داد و به همین علت به آن (OCC-1) Overexpressed in Colon Carcinoma گفته شد (۴). از این رو هدف از مطالعه حاضر کاهش بیان یک رونوشت ژن OCC-1 در رده سلولی سرطان کولورکتال (SW480) از طریق ترانسفکشن (Transfection) سلولها با shRNA (Short hairpin RNA) می‌باشد.

روش کار

با توجه به همپوشانی توالی رونوشت‌های حاصل از ژن OCC-1 و نیز با توجه به هدف این مطالعه که فقط کاهش بیان یک رونوشت از این ژن بوده است، طراحی shRNA برای ناحیه‌ای از رونوشت مورد مطالعه صورت گرفت که در سایر رونوشتها وجود نداشت. به منظور طراحی سازه کاهنده بیان از نرم‌افزارهای آنلاین طراحی siRNA مانند سایت <http://www.sirnawizard.com> و <http://www.invitrogen.com> استفاده شد. با استفاده از برنامه بلاست (BLAST) در بانک اطلاعاتی (National Center for Biochemistry Information) (NCBI) ترتیب نوکلئوتیدهای آن بررسی و صحت منحصر بفرد بودن آن در کل ژنوم انسان نیز تایید شد. طول توالی با احتساب قطعه لازم برای همپوشانی آغازگرهای سازنده shRNA و جایگاه‌های برش آنزیمی، ۸۳ باز در نظر گرفته شد، همچنین صحت تشکیل حالت ساقه-حلقه آن با استفاده از نرم‌افزار <http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi> تایید گردید (شکل ۱). سپس سازه به صورت دو قطعه ۴۲ نوکلئوتیدی با توالی ACCACTTAGGATCCGGGAGCGCGGGCCAAGGCC و ۵۶ نوکلئوتیدی با توالی CACTCGAGA GTCGACAAGCTTTTCCAAAAAAGGGAGCGCGGT CAAGGCCCTCTCGAGTGGGCCT که دارای ۱۵ نوکلئوتید همپوشان بود برای ساخت به شرکت ماکروژن (Macrogen) کره‌جنوبی سفارش داده شد. تکثیر این قطعه به این صورت انجام شد که ابتدا یک دور واکنش PCR با استفاده از

استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 انجام پذیرفت و P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. توالی آغازگرهای (Primer) ژن GAPDH و رونوشت ژن OCC-1، که برای طراحی آنها پارامترهای نرم‌افزار Oligo 7 لحاظ شده بود، در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: توالی آغازگرهای ژن‌های GAPDH و رونوشت OCC-1

نام ژن	توالی آغازگر مربوطه
OCC-1 F	AGAGCTCCGGAGCGCGGGCC
OCC-1 R	CCTTCCCTTTTGCATTCCCC
GAPDH F	GCCACATCGCTCAGACAC
GAPDH R	GGCAACAATATCCACTTTACCAG

Forward: رفت برگشت

یافته‌ها

سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسמיד کنترل (پلاسמיד هم‌اندازه پلاسמיד سازه خاموش‌گر) حاوی ژن GFP در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند. تصویری از سلول‌های SW480 ترانسفکت شده در شکل ۲ آمده است. مقایسه تعداد سلول‌های سبز رنگ بیان‌کننده ژن GFP، در شکل ۲ الف نسبت به کل سلول‌های نشان داده شده در شکل ب (عکس نوری)، نشان‌دهنده درصد بالای ترانسفکشن بوده است. آزمایش‌ها ۴ بار تکرار گردید که در هر ۴ مورد میزان ترانسفکشن یکسان بوده است. وجود باندهای 18s و 28s روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که RNA های استخراج شده از کیفیت مطلوبی برخوردار است. بررسی نیمه کمی بیان ژن هدف با RT-PCR نیمه کمی کاهش بیان رونوشت OCC-1 در نمونه ترانسفکت شده با سازه خاموش‌گر نسبت به نمونه کنترل را نشان داد (شکل ۳).

مقایسه میزان نسبی بیان ژن هدف در دو گروه سلولی ترانسفکت شده در زمان ۲۴ ساعت تغییر چشمگیری نداشت، در صورتیکه در زمان ۷۲ ساعت کاهش بیان حدود ۲۵ درصدی رونوشت مورد نظر در سلول‌های ترانسفکت شده با سازه خاموش‌گر نسبت به میزان آن در سلول‌های کنترل منفی را نشان داد (شکل ۴).

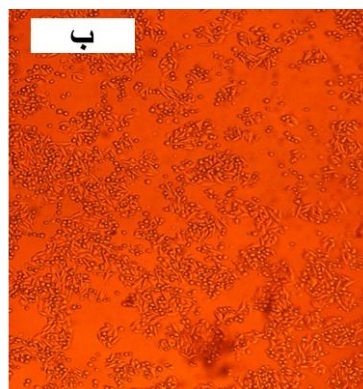
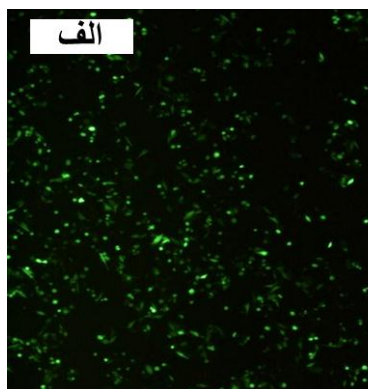
و لیپوفکتامین ایجاد شود. بدین منظور ابتدا ۸۰۰ نانوگرم از وکتور در ۵۰ میکرولیتر Opti-MEM (Invitrogen) رقیق و چندین بار به آرامی مخلوط گردید. سپس ۱/۵ میکرولیتر از لیپوفکتامین در ۵۰ میکرولیتر Opti-MEM (Invitrogen) مخلوط شد و به منظور افزایش بازدهی ترانسفکشن به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس این دو محلول با هم مخلوط شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا کمپلکس لیپوفکتامین-DNA (Lipofectamin-DNA) ایجاد شود. کمپلکس تشکیل شده به آرامی به محیط سلول‌ها اضافه گردید و پلیت به مدت ۶ ساعت در انکوباتور قرار گرفت؛ برای هر گروه ۲ تکرار در نظر گرفته شد و بعد از این مدت محیط سلول‌ها با محیط کامل تعویض گردید. در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن، RNA سلول‌ها استخراج و از روی آن cDNA ساخته شد و تغییر بیان ژنی برای هر چاهک با ۴ بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

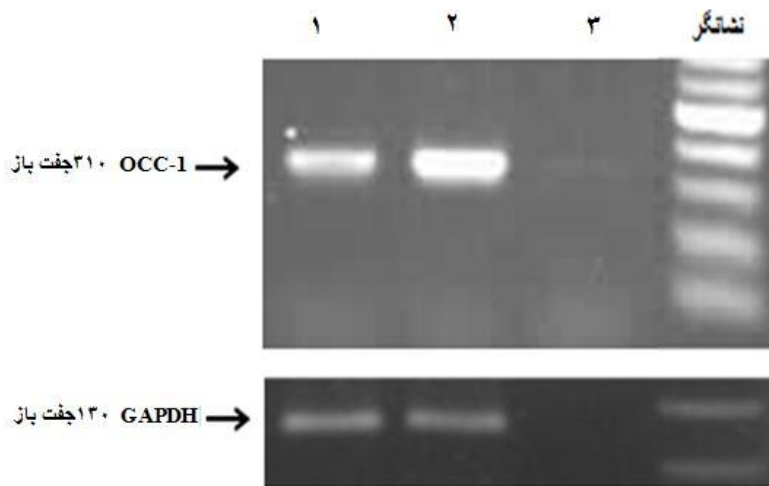
RNA سلول‌ها با استفاده از Trizol و براساس برنامه شرکت (Invitrogen) تخلیص و سپس کمیت و کیفیت آن با دستگاه Nanodrop و الکتروفورز ژل آگارز تایید شد. حدود یک میکروگرم RNA استخراج شده برای سنتز cDNA با استفاده از کیت RT-PCR (RevertAid™ M-MuLV) (Fermentas) به کار رفت.

پس از ساخت cDNA برای بررسی صحت سنتز با استفاده از آغازگر ژن خانه‌دار GAPDH (Housekeeping gene) و هم‌چنین بررسی کیفی میزان بیان ژن هدف با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رونوشت مورد نظر، برای هر دو گروه سلول واکنش PCR انجام شد. بررسی میزان تغییرات بیان ژن OCC-1D

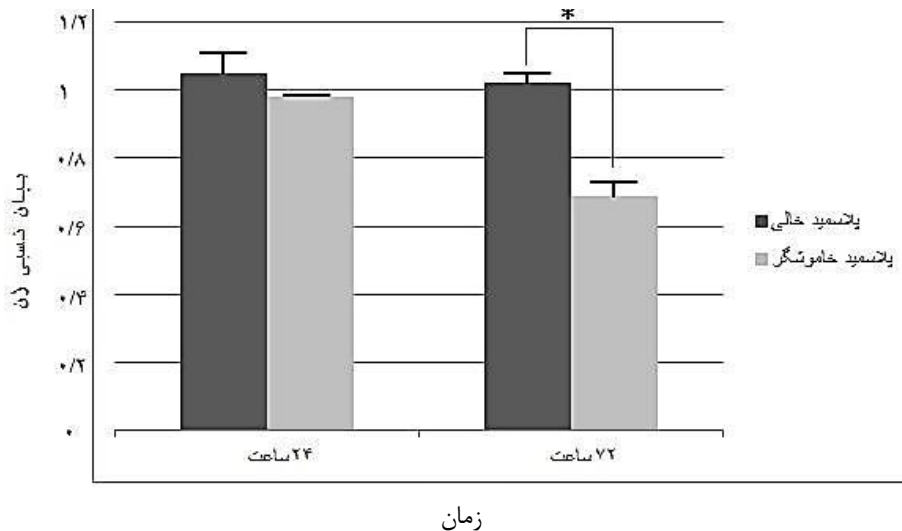
به منظور بررسی میزان تغییرات بیان رونوشت ژن OCC-1 از روش‌های نیمه کمی و کمی استفاده شد. روش نیمه کمی بوسیله PCR معمولی و روش کمی بوسیله EvaGreen و دستگاه Real-Time PCR (StepOne) صورت پذیرفت. بیان ژن هدف به صورت کمی در مقایسه با ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی بررسی شد. برای محاسبه بیان ژن فرمول $(\Delta\Delta C_t) = 2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با



شکل ۲ بررسی کارایی ترانسفکشن سلول‌های SW480 با وکتور هم‌اندازه سازه خاموش‌گر. الف: تصویر فلورسنت، ب: تصویر نوری سلول‌های ترانسفکت شده



شکل ۳ بالا مقایسه نیمه کمی رونوشت OCC-1 در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای pRNA-H1.1/Neo خاموش گر (ستون ۱)، pRNA-H1.1/Neo خالی (ستون ۲) و کنترل منفی RT-PCR (ستون ۳). شکل پایین، سطح بیان ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.



شکل ۴ نمودار مقایسه بیان رونوشت ژن OCC-1 در مقایسه با ژن کنترل آن GAPDH در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی pRNA-H1.1/Neo و پلاسمید خاموش گر؛ در زمان ۲۴ ساعت تفاوت چشمگیری بین نمونه کنترل و خاموش گر مشاهده نمی‌شود در حالیکه در زمان ۷۲ ساعت بیان رونوشت ۲۵ درصد کاهش را نشان می‌دهد.

بحث

عملکرد آن‌ها در مهار بیان ژن مورد نظر محدود می‌باشد. بنابراین استفاده از ناقل‌ها در روش shRNA (Short hairpin RNA) علاوه بر بیان پایدار خاموش گر، از لحاظ هزینه مقرون به صرفه‌تر نیز می‌باشد (۶-۸). shRNA ها از لحاظ طراحی به دو گروه تقسیم می‌شوند، یکی از انواع آن‌ها ساختار ساقه-حلقه داشته و اغلب تحت کنترل پروموتور RNAPolIII مثل U6 و H1 قرار دارد (۹-۱۰). ساختارهای ساقه-حلقه از حدود ۶۰-۸۰ باز تشکیل شده که ۱۹ تا ۲۹ باز آن به صورت دو رشته‌ای در قسمت ساقه و بقیه آن‌ها در قسمت حلقه تک رشته‌ای قرار دارند (۱۱-۱۳). ShRNA ها با ساختار ساقه-حلقه در هسته رونویسی شده و همانند یک Pre-microRNA وارد مسیر RNAi (RNA interference) می‌شوند. بدین صورت که پس

مطالعات گذشته نشان داده است که بیان بسیاری از ژن‌های دخیل در تکثیر سلولی در طی بیماری‌های مختلف از جمله سرطان افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند. یکی از راهکارهای درمان و یا پیشگیری از بیماری‌های متأثر از افزایش بیان ژن‌ها، استفاده از فناوری shRNA خاموش گر، به منظور کاهش بیان چنین ژن‌هایی می‌باشد (۳ و ۵). RNAهای تداخل گر جز دسته‌ای از RNAهای غیرکدکننده هستند که شامل shRNA، siRNA، shRNAmir می‌باشند. این RNAها بیان ژن را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند و اختصاصیت و کارایی بالایی برای مهار بیان ژن‌ها و همچنین توانایی انتقال به انواع سلولهای جانوری را دارند. یکی از ضعف‌های سیستم‌های siRNA، عمر نسبتاً کوتاه آن‌هاست. به همین علت

بود چرا که در این مدت احتمالاً پلاسمید وارد هسته نشده و یا به علت کم بودن سرعت رونویسی RNAPolIII از پروموتور H1 در پلاسمید pRNA-H1.1/Neo هنوز رونویسی کامل خاموش‌گر صورت نگرفته است تا بتوان تأثیر آن را بر بیان ژن هدف مشاهده نمود. همچنین بررسی بیان رونوشت مورد هدف در زمان ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن، کاهش حدود ۲۵ درصدی بیان رونوشت نسبت به نمونه کنترل را نشان داد (شکل ۴). با توجه به محدودیت‌های تحقیق حاضر، که در قسمت بحث به آن پرداخته شد، این مقدار کاهش بیان قابل قبول می‌باشد، در نتیجه برای کاربردهای آینده مناسب به نظر می‌رسد. پیشنهاد می‌شود تأثیر خاموش‌گری این سازه بر رونوشت ژن OCC-1، به عنوان یکی از کاندیدهای احتمالی موثر در ایجاد سرطان کولورکتال، در مسیرهای مختلف سلولی و همچنین چرخه سلولی بررسی شود.

قدردانی

بدینوسیله از زحمات خانم دکتر سادات دوکانه ای فرد و فهیمه السادات حسینی که بنده را در انجام این پروژه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم. تحقیق حاضر تحت حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفت.

از رونویسی توسط RNAPolIII ساختار ساقه-حلقه توسط اکسپورتین ۵ (Exportin5) از هسته خارج شده و در سیتوپلاسم آنزیم دایسر آن را برش داده، سپس در کمپلکس RISC (RNA-induced Silencing Complex) مانع عملکرد رونوشت ژن مورد هدف می‌شود (۱۴). با توجه به اهمیت ژن OCC-1 در سرطان کولورکتال و بیان بالای رونوشت‌های آن در این سرطان (۴)، در تحقیق حاضر پلاسمید خاموش‌گر یکی از رونوشت‌های این ژن طراحی و ساخته شد و با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ Lipofectamin وارد سلول SW480 گردید، سپس در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن، RNA سلول‌ها استخراج و از روی آن‌ها cDNA ساخته شد؛ و تغییرات بیانی ژن هدف مورد بررسی قرار گرفت. هم‌پوشانی قسمت‌های مختلف رونوشت‌های ژن OCC-1 باعث شد که تنها یک ناحیه منحصربفرد و مناسب جهت طراحی سازه خاموش‌گر رونوشت مورد نظر وجود داشته باشد و از آن‌جایی که برای سرکوب قطعی یک ژن لازم است از چندین سازه خاموش‌گر برای قسمت‌های مختلف استفاده شود (۱۵)، محدودیت‌هایی در این تحقیق وجود داشت.

نتیجه‌گیری

عدم تفاوت چشمگیر بیان رونوشت مورد هدف در سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خاموش‌گر و سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید خالی در زمان ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن قابل انتظار

References

- Bernards R, Brummelkamp TR, Beijersbergen RL. shRNA libraries and their use in cancer genetics. *Nature Methods* 2006; **3**:701-706. doi: 10.1038/nmeth921
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; **411**: 342-348. doi: 10.1038/35077213
- Bora RS, Gupta D, Mukkur TK, Saini KS. RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities (Review). *Molecular Medicine Reports* 2012; **6** Issue1: 9-15. doi: 10.3892/mmr.2012.871
- Pibouin L, Villaudy J, Ferbus D, Muleris M, Prospéri MT, Remvikos Y, et al. Cloning of the mRNA of overexpression in colon carcinoma-1: a sequence overexpressed in a subset of colon carcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2002; **133**(1): 55-60. doi: 10.1016/s0165-4608(01)00634-3
- Barik S. Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. *Journal of Molecular Medicine* 2005; **83**: 764-773. doi: 10.1007/s00109-005-0690-0
- Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003; **80**(1): 121-128. doi: 10.1016/j.ymgme.2003.08.011
- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery Reviews* 2009; **61**: 746-759. doi: 10.1016/j.addr.2009.04.004
- Kim VN. RNA interference in functional genomics and medicine. *Journal of Korean Medical Science* 2003; **18**(3): 309-318.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; **116**(2): 281-297. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005; **6**: 376-385. doi: 10.1038/nrml644
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; **296**: 550-553. doi: 10.1126/science.1068999
- Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; **99**(3): 1443-1448. doi: 10.1073/pnas.032652399
- Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology* 2002; **20**: 505-508. doi: 10.1038/nbt0502-505
- Rao DD, Senzer N, Cleary MA, Nemunaitis J. Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development. *Cancer Gene Therapy* 2009; **16**: 807-809. doi: 10.1038/cgt.2009.53
- Xia X, Zhou H, Xu Z. Multiple shRNAs expressed by an inducible pol II promoter can knock down the expression of multiple target genes. *BioTechniques* 2006; **41**(1): 64-68. doi: 10.2144/000112198